

**Zum Polymorphismus der
alkalischen Phosphatase (EC 3.1.3.1.)
im Serum von Schwangeren zur Zeit
der Geburt, in Nabelschnurseren sowie
in Plazenta-Extrakten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Frank Müller
aus Stendal

Marburg 1976

**Zum Polymorphismus der
alkalischen Phosphatase (EC 3.1.3.1.)
im Serum von Schwangeren zur Zeit
der Geburt, in Nabelschnurseren sowie
in Plazenta-Extrakten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Frank Müller

aus Stendal

Marburg 1976

Druck: Mauersberger, Marburg/L.



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 20.2.1976

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen

Referent: Prof. Dr. med. I. Oepen

Correferent: Prof. Dr. med. F. Schleyer

I. Einleitung

1. Begriffsbestimmung	1
2. Zweck und Umfang der Untersuchung	2
III. Fragestellung	3

II. Hauptteil

1. Einleitung	13
2. Hauptteil	13
3. Ergebnisse	19
4. Zusammenfassung	19
5. Meiner Frau gewidmet	19
6. Schluss	19

Meiner Frau gewidmet

7. Literaturverzeichnis	21
8. Anhang	21
9. Zusammenfassung	21
10. Schluss	21
11. Literaturverzeichnis	21
12. Anhang	21

C. Zusammenfassung

D. Literaturverzeichnis

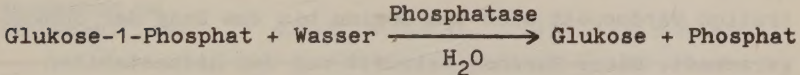
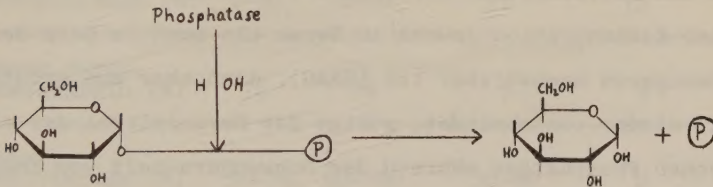
I n h a l t

	Seite
A. <u>Einleitung</u>	
I. Definitionen	5
II. Bisher vorliegende Befunde	8
III. Fragestellung	11
B. <u>Eigene Untersuchungen</u>	
I. Material und Methode	13
1. Material	13
2. Methode	14
a) Elektrophorese bei pH 8.4 bis pH 8.6 . .	14
b) Elektrophorese bei pH 6.0	15
c) Färbung der alkalischen Phosphatase in modifizierter Technik nach LAWRENCE	16
II. Vorversuche	18
Vergleich der drei Färbemethoden nach BOYER, BECKMAN und LAWRENCE	19
III. Hauptversuche	20
Befunde und Diskussion	20
C. <u>Zusammenfassung</u>	29
D. <u>Literatur</u>	31

A. Einleitung

I. Definitionen

Als alkalische Phosphatase wird eine Gruppe relativ unspezifischer Enzyme bezeichnet, die Phosphorsäureester bei einem pH-Optimum im alkalischen Bereich (pH 8.2 bis 10.7) spalten.



Im menschlichen Serum kommen alkalische Phosphatasen aus mindestens 5 Organen oder Zellsystemen vor: Osteoblasten, Dünndarm, Leber, Plazenta und Niere.

Chemisch handelt es sich bei der alkalischen Phosphatase um ein Glykoprotein. Ihr Molekulargewicht liegt bei 116000. GOTTSLIEB und SUSSMAN fanden, daß es sich bei der humanen alkalischen Phosphatase aus der Plazenta um ein Dimer handelt, d.h. das Molekül ist aus 2 Monomeren mit identischen Molekulargewichten von jeweils 58000 zusammengesetzt.

Die enzymatische Reaktion verläuft in 2 Phasen:

1. Nach der Formation des Enzym-Substrat-Komplexes wird durch Hydrolyse des Substrates Phosphoryl-Enzym plus Produkt gebildet.
2. Das Phosphoryl-Enzym wird in Enzym und anorganisches Phosphat aufgespalten.

Im Gegensatz zum menschlichen Choriongonadotropin (HCG), das während der ersten 3 bis 4 Monate der Schwangerschaft von den Chorionzotten der Plazenta gebildet wird und in hoher Konzentration sowohl im Serum als auch im Urin der Schwangeren nachweisbar ist (HAAG), dann aber zum größten Teil wieder verschwindet, steigt der Serumspiegel der alkalischen Phosphatase während der Schwangerschaft vom Ende des ersten Trimenons bis zur Geburt an. Die Enzymkonzentration verdoppelt sich vom Beginn bis zum Ende der Schwangerschaft. Diese Zunahme betrifft nur den hitzestabilen Anteil der Enzymgruppe, der plazentaren Ursprungs ist. Er ist in kleinen Mengen auch noch nach der Geburt bis zur 12. Woche post partum nachweisbar (CAYLA und FABRE, McMASTER et al.).

Wie MILLER et al. gezeigt haben, steigt während der Schwangerschaft neben der Aktivität der alkalischen Phosphatase auch die der Cystin-Amino-Peptidase und der Leucin-Amino-Peptidase im mütterlichen Blut an. Ebenso ist ein Anstieg der Histaminase-Aktivität (SCHLEYER, s. dort weitere Literatur) zu beobachten.

Außer der Hitzestabilität der menschlichen plazentaren

alkalischen Phosphatase gibt es noch andere Kriterien, die eine Ermittlung des Bildungsorganes und eine Unterscheidung zwischen den alkalischen Phosphatasen zulassen. Diese Zusammenhänge gehen aus der nachfolgenden Tabelle 1 hervor:

	Leber	Knochen	Dünndarm	Plazenta
Hemmung durch L-Phenylalanin (%)	0-10	0-10	75	75
Hemmung durch L-Homoarginin (%)	78	78	5	5
Hitze- Inaktivierung (%)	50-70	90-100	50-60	0
Wanderung im Stärkegel (cm)	4.4-5	4.0-6.0	3.0	3.8-4.2
Effekt nach Vor- behandlung mit Neuraminidase	+	+	0	+
Reaktion mit ver- dünnten Antiseren gegen das plazen- tare Isoenzym	0	0	0	+
Reaktion mit ver- dünnten Antiseren gegen das Leber- Isoenzym	+	+	0	0
Reaktion mit ver- dünnten Antiseren gegen das Dünndarm- Isoenzym	0	0	+	0

Tab. 1. (nach FISHMAN) Eigenschaften der humanen alkalischen Phosphatasen in Abhängigkeit vom Bildungsort

II. Bisher vorliegende Befunde

BOYER beschrieb als erster den genetischen Polymorphismus der alkalischen Phosphatase. Er fand in der vertikalen Stärkegel-Elektrophorese bei pH 9.7 bei 20 Schwangeren 3 Phänotypen und stellte eine Übereinstimmung der Serummuster mit der Darstellung aus den Plazenta-Extrakten dieser Probandinnen fest. Die Seren enthielten jeweils noch eine langsamer wandernde Bande, die in den Plazenta-Extrakten nicht zu beobachten war. Im Nabelschnurblut wurde dagegen ein anderes Bild gefunden mit einer einzelnen, sehr langsam wandernden Bande, die bei Erwachsenen nicht auftrat. Als Ursache für diesen abweichenden Befund wurde eine Schranke in der Plazenta angenommen.

BOYER's Befunde wurden hinsichtlich des Polymorphismus der alkalischen Serum-Phosphatase von BECKMAN und GRIVEA in der horizontalen Stärkegel-Elektrophorese bei pH 9.2 nachgeprüft. Sie fanden wie BOYER bei Frauen zum Geburtstermin 3 Phänotypen (Abb. 1, Proben 1-3) und im Nabelschnurblut die einzelne, langsamer wandernde Bande. 4-5% von 274 Neugeborenen wiesen außerdem - im Gegensatz zu BOYER - eine schneller wandernde Bande ebenso wie ein Teil der Schwangeren auf (Abb. 1, Proben 4 und 5). Die Ehemänner der untersuchten Frauen zeigten ein Muster ohne die schnell wandernden Banden, die in der Schwangerschaft auftreten, dagegen in 40% der 131 Fälle eine besonders langsame Fraktion (Abb. 1, Proben 6 und 7). Diese wurde nur bei 10% von 264 Frauen zur Zeit der Entbindung beobachtet und war dann

meistens schwächer als bei den Männern. Ein Vergleich mit dem Muster aus Plazenta-Extrakten der untersuchten Frauen wurde aber nicht vorgenommen.

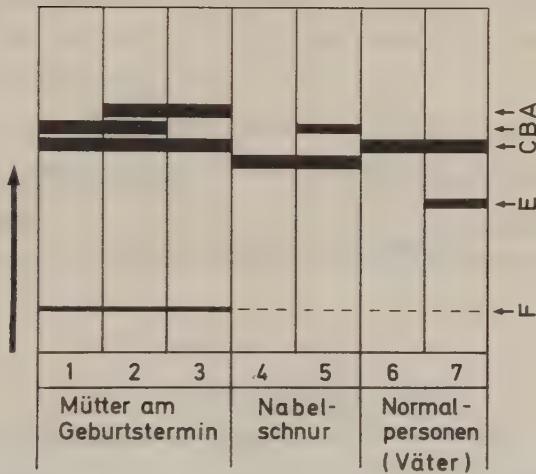


Abb. 1. Schematische Darstellung von Serummustern der hitze-stabilen alkalischen Phosphatase nach BECKMAN und GRIVEA (horizontale Stärkegel-Elektrophorese, pH 9.2)

ROBSON und HARRIS untersuchten 338 Plazenta-Extrakte in der horizontalen Stärkegel-Elektrophorese und zwar in zwei Arbeitsgängen bei pH 8.6 und 6.0. Mit dieser Technik konnten sie 6 häufige Phänotypen unterscheiden (Abb. 2, erster Teil). Für die Vererbung dieser Phänotypen nahmen

sie ein Modell von 3 autosomalen Allelen an, da die Frequenzen der Varianten in Einklang mit dem HARDY-WEINBERG-Gesetz standen.

In einer späteren Veröffentlichung berichteten die Autoren über die Beobachtung von weiteren 9, jedoch seltenen Phänotypen (Abb. 2, zweiter Teil). Das Genmodell wurde daher von 3 häufigen um 6 seltene Allele eines autosomalen Genlocus erweitert.

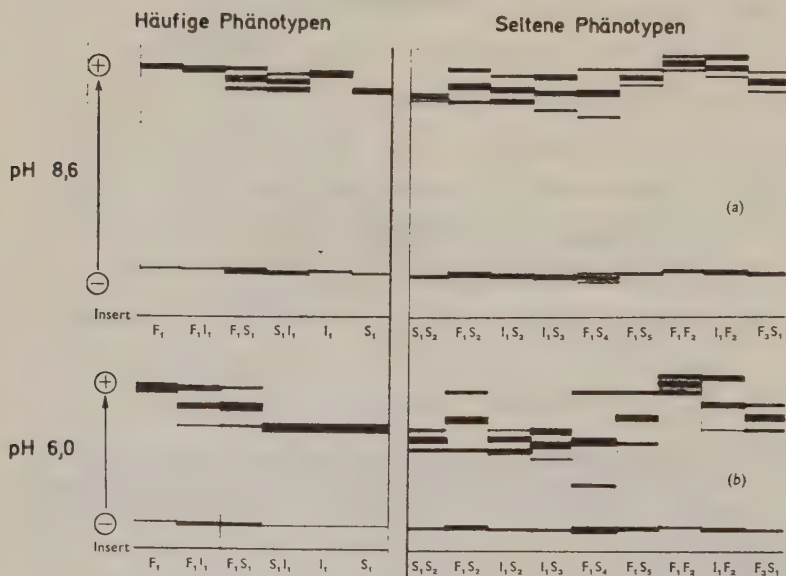


Abb. 2. Schematische Darstellung von Plazenta-Typen der hitzestabilen alkalischen Phosphatase nach ROBSON und HARRIS (horizontale Stärkegel-Elektrophorese; Auftrennung in zwei Arbeitsgängen)

Die Untersuchung der Plazenta-Extrakte von 400 heterozygoten Zwillingen zeigte, daß der Phänotyp der alkalischen Plazenta-Phosphatase vom Genotyp des Feten bestimmt wird, was nicht verwundert, da die Plazenta fetalen Ursprungs ist. Außer den beschriebenen Hauptfraktionen traten auch lang-samer wandernde, schwächere Zonen auf, die Variationen aufwiesen, welche aber im Folgenden außer acht gelassen werden, da sie entbehrlich sind. Sie wurden auch von ROBSON und HARRIS 1967 anders beschrieben als 1965.

BECKMAN et al. haben diese Befunde an Plazenta-Extrakten im wesentlichen bestätigt. THOMAS und HARRIS erklärten die etwas geringere Aktivität der homo- und heterozygoten I-Typen gegenüber S- und F-Typen mit deren geringerer Thermostabilität.

III. Fragestellung

Der reiche Polymorphismus der alkalischen Plazenta-Phosphatase verhieß eine besonders gute Eignung für forensische Fragen, zumal die Frequenzen der Varianten Unterschiede in verschiedenen Populationen zeigten (BOYER; BECKMAN und BECKMAN; ISHIMOTO; BOTTINI et al.). Außerdem schien günstig, daß OYA die Aktivität des Fermentes auch an getrockneten Spuren von Schwangerenblut festgestellt und ihren Nachweis als Test für die Untersuchung von Schwangeren- und Geburtsblut empfohlen hatte.

Nach den vorliegenden Befunden mußte vermutet werden, daß

das Serummuster der alkalischen Phosphatase am Ende der Schwangerschaft und kurz nach der Geburt eine Zuordnung zum Muster der alkalischen Plazenta-Phosphatase dieser Frauen gestatten würde. Es bestand die Aussicht, daß die verbesserte Technik von ROBSON und HARRIS den an Plazenta-Extrakten festgestellten vielfältigen Polymorphismus in entsprechender Weise auch an den Seren schwangerer Frauen sowie an Blutspuren erkennen ließe, da erwiesen war, daß der hitzestabile Anteil der Enzymgruppe placentaren Ursprungs ist. Damit hätten die Untersuchungsmöglichkeiten bei Kindes-tötung und verheimlichter Geburt verbessert werden können.

B. Eigene Untersuchungen

I. Material und Methode

1. Material

In der Universitäts-Frauenklinik Marburg⁺⁺ wurden unmittelbar nach der Geburt entnommen:

- a) mütterliches Venenblut
- b) Nabelschnurblut
- c) Plazentateile von 3-7 cm Durchmesser
- d) mit Plazentablut getränkte Stoffstücke.

Von insgesamt 73 Fällen wurden untersucht:

66mal Venenblut der Mutter, Nabelschnurblut und die entsprechende Plazenta;

7mal nur Plazenta, ohne dazugehörende Blutproben.

In einem Versuch wurde der geringere Gehalt an alkalischer Phosphatase im Blut von nichtschwangeren weiblichen und von männlichen Personen mit dem Blut von schwangeren Frauen verglichen.

Ferner wurden Alterungsversuche mit der plazentaren alkalischen Phosphatase angestellt.

Das Material wurde in folgender Weise aufbereitet:

- 1) Blut: a) Zentrifugieren 5 min. bei 3000 U/min.
b) Abpipettieren des Überstehenden Serums in Reagenzgläser

⁺⁺ An dieser Stelle sei den Hebammen der Univ.-Frauenklinik Marburg für ihre freundliche Hilfe bei der Beschaffung des Untersuchungsmaterials gedankt.

- c) Aufbewahrung des Serums bei -20°C
 - d) Vorbehandlung der Serumproben vor der Elektrophorese: 30 min. inkubieren bei 56°C zur Eliminierung der hitzelabilen alkalischen Phosphatase.
- 2) Plazenta:
- a) Zerkleinerung der Gewebsproben in einer sog. "Kaumaschine" (= kleiner Küchenfleischwolf)
 - b) Aufbewahrung der zerkleinerten Proben in Glasröhrchen bei -20°C .
- 3) Stoffproben: Trocknung und anschließende Lagerung der mit Plazentablut getränkten Stoffreste (verschiedene Materialien: Leinen, Nylon, Baumwoll-Synthetik-Gemisch) bei Zimmertemperatur entsprechend den Bedingungen in Routinefällen.

2. Methode

Die Phänotypen der alkalischen Phosphatase wurden mit Hilfe der horizontalen Stärkegel-Elektrophorese nach SMITHIES in der von ROBSON und HARRIS beschriebenen Modifikation bestimmt:

a) Elektrophorese bei pH 8.4 bis 8.6

- 1) Herstellung des Gelpuffers nach POULIK (pH 8.4 bis 8.6):
 - 0,076 M Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (MG = 121,12)
9,19 g/l
 - 0,007 M Citronensäure (MG = 210,14) 1,4 g/l
 - Aqua dest. ad 1000 ml (Sorgfältige pH-Kontrolle!)

2) Herstellung des Brückenpuffers (pH 7.95):

0,3 M Borsäure (MG = 61,83) 18,5 g/l
10 N NaOH (MG = 40,0) zur Einstellung auf pH 7.95
Aqua dest. ad 1000 ml

3) Herstellung des Stärkagels (12,6%):

Stärke und Gelpuffer werden unter ständigem Rühren zusammen erhitzt, bis das Gemisch "brodelte". Danach wird die Luft mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Gel muß dann sofort in die Trennkammer gegossen werden.

4) Versuchsanordnung:

- a) Beimpfung des erkalteten Gels mit Impflättchen aus Filterpapier (Whatman Chromatography Paper Nr. 3MM) 6 cm von der Kathode entfernt.
- b) Anlegen der Spannung mit einem Spannungsgradienten von 6 V/cm,
25 mA am Gerät (Netzgerät Typ DC 600 V, Fa. Vogel, Gießen) einstellen. Der Wert der Stromstärke ist ausschlaggebend; unter Umständen muß eine höhere Spannung in Kauf genommen werden.
- c) Die Laufzeit beträgt 6 h bei Zimmertemperatur.

b) Elektrophorese bei pH 6.0

1) Herstellung des Gelpuffers nach ROBSON (1965) (pH 6.0):

0,0025 M Bernsteinsäure (MG = 118,09) 0,3 g/l
0,0046 M Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
(MG = 121,12) 0,56 g/l

Beide Substanzmengen werden in Aqua dest. gelöst
und auf 1000 ml aufgefüllt; anschließend pH-Kontrolle.

2) Herstellung des Brückenpuffers (pH 6.0):

0,41 M Citronensäure (MG = 210,14) 86,2 g/l

10 N NaOH zur Einstellung auf pH 6.0

Aqua dest. ad 1000 ml

3) Herstellung des Stärkegels (11,6%): s. oben

4) Versuchsanordnung:

a) Beimpfung 6 cm von der Kathode entfernt

b) Anlegen der Spannung mit einem Spannungsgradienten
von 8 V/cm,

25 mA am Gerät einstellen

c) Laufzeit: 6 h bei 5°C (Kühlschrank)

c) Färbung der alkalischen Phosphatase in modifizierter
Technik nach LAWRENCE

Reagenzien:

1) Natriumnaphthyl-(1)-phosphat

2) Echt Blau RR-Salz

3) $MgSO_4$ -Lösung (10%ig)

4) Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan

5) Citronensäure

Färbepuffer: 0,1 M Tris = 12,114 g/l (pH 8.8)

0,6 g Citronensäure in Aqua bidest. lösen
und auf 400 ml (0,007 M) auffüllen.

Darin 12,1 g Tris lösen und mit Aqua bides
auf 1000 ml auffüllen.

Färbelösung: 200 mg Natriumnaphthyl-(1)-phosphat und
200 mg Echt Blau RR-Salz in
20 ml Färbepuffer lösen,
20 Tropfen 10%ige MgSO_4 -Lösung hinzufügen.

Entwicklung: Die Stärkegele werden aus den Trennkammern
herausgenommen und horizontal in der Mitte
durchtrennt, mit den Schnittflächen nach
oben in die Färbekammern gelegt und mit
10 ml der Färbelösung übergossen.

Färbedauer : 30-60 min. bei 37°C

Danach Absaugen der Färbelösung mittels
Wasserstrahlpumpe; das Ergebnis kann dann
abgelesen werden.

Prinzip der Färbung:

Für die Phosphatasen, die die Hydrolyse einer großen
Zahl von Phosphateestern katalysieren, dient Natrium-
naphthyl-(1)-phosphat als Substrat. Im alkalischen
Milieu entsteht so bei den vorliegenden Versuchen alpha-
Naphthol, das mit dem Diazoniumsalz Echt Blau RR zu
einem blau-violetten Azofarbstoff kuppelt. Dieser tritt
an der Stelle der Enzymaktivität in Erscheinung. Mg^{2+} -
Ionen bewirken eine Verstärkung der Enzymaktivität.

II. Vorversuche

Während der Vorversuche bereitete die Technik der Elektrophorese keinerlei Schwierigkeiten, dagegen traten bei der Anfärbung der alkalischen Phosphatase nach der elektrophoretischen Auftrennung einige Schwierigkeiten auf.

Es wurden 3 verschiedene Färbemethoden nachgearbeitet und zum Teil modifiziert.

Nach elektrophoretischer Auftrennung bei pH 6.0 stellte sich die von BOYER angegebene Färbung als zu schwach für den Enzymnachweis heraus. Auch die Färbemethoden nach BECKMAN (1965) sowie nach LAWRENCE ergaben bei der Elektrophorese bei pH 6.0 keine befriedigenden Ergebnisse. Dagegen ließ sich die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase bei der Auftrennung im alkalischen Milieu (pH 8.6) mit allen Färbemethoden gut darstellen, was wohl daran liegt, daß dieses Milieu dem pH-Optimum der plazentaren alkalischen Phosphatase näher liegt als das bei pH 6.0. Das Optimum des hitzestabilen Anteils der alkalischen Phosphatase liegt im Bereich von pH 10.7 (FISHMAN). Auch KÖHLER hat bei seinen Untersuchungen einen ähnlichen pH-Bereich festgestellt (pH 10.1 bis 10.2).

Durch Kombination der einzelnen Komponenten der 3 Färbemethoden wurde schließlich das auf Seite 16 angegebene Rezept als am besten geeignet ermittelt. Es ist allerdings hervorzuheben, daß auch hiermit keine optimale Anfärbung bei pH 6.0 gelang.

Vergleich der drei Färbemethoden nach
BOYER, BECKMAN (1965) und LAWRENCE

1) BOYER

0,05% beta-Naphthyl-Na-Phosphat

0,005 M MgSO_4

0,05% Echt Blau RR-Salz

Puffer: 0,06 M Natriumborat/Borsäure (pH 9.7)

Inkubation des Gels für 30-60 min. bei 37°C.

2) BECKMAN

Tris/Citronensäure-Puffer (pH 9.0)

alpha-Naphthylphosphat

Echt Blau RR-Salz

Inkubation des Gels für 60 min. bei 37°C.

, Danach wird das Gel über Nacht in einer Entfärbelösung aus Methanol, Essigsäure und Wasser im Mischungsverhältnis 5:5:1 aufbewahrt.

3) LAWRENCE

200 ml 0,1 M Tris-Puffer (pH 8.8)

200 mg Natrium-alpha-Naphthyl-Phosphat

200 mg Echt Blau RR-Salz

20 Tropfen 10%ige MgCl -Lösung

Das Gel wird in dieser Färbelösung 12 h lang bei 37°C inkubiert.

Danach Entfärbung in einem Alkohol-Essigsäure-Wasser-Gemisch (Mischungsverhältnis 5:5:1).

III. Hauptversuche

Befunde und Diskussion

Es wurde in 66 Fällen ein Vergleich angestellt zwischen Venenblut von Müttern zur Zeit der Geburt, Plazenta-Extrakt und Nabelschnurblut und dabei die von ROBSON und HARRIS angegebene Modifikation der horizontalen Stärkegel-Elektrophorese nach SMITHIES bei pH 8.6 und pH 6.0 angewandt. Ferner wurden 7 weitere Plazenta-Extrakte ohne zugehörige Blutproben sowie Alterungsvorgänge, Blutspuren und 5 Blutproben nichtschwangerer Personen (4 weibliche, 1 männliche) untersucht.

Die Verteilung der in den Plazenta-Extrakten gefundenen Phänotypen zeigte trotz der kleinen Vergleichszahl eine gute Übereinstimmung mit den von ROBSON und HARRIS veröffentlichten Frequenzen (Abb. 3). Die Muster ließen sich aber zum Teil sehr schwer mit den bestechend guten Schemata der britischen Autoren in Einklang bringen. Der Vergleich mit deren Befunden wurde ferner dadurch erschwert, daß ihre Arbeiten nur sehr wenige Originalfotos enthalten, was wegen der schlechten Darstellbarkeit verständlich ist.

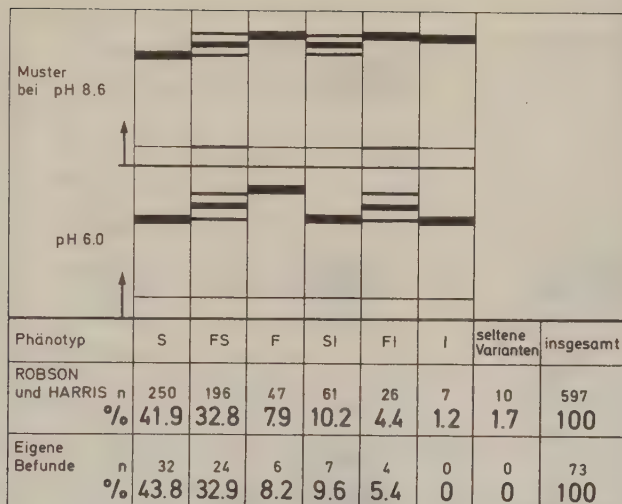


Abb. 3. Plazentatypen der hitzestabilen alkalischen Phosphatase schematisch nach ROBSON und HARRIS (1965) mit Frequenzen in England und Marburg

Abb. 4 zeigt Lichtbilder von eigenen Pherogrammen, aus denen außer den grundsätzlichen Typisierungsschwierigkeiten noch hervorgeht, daß sich die Fraktionen bei pH 6.0 wegen des für das Enzym ungünstigen Milieus weniger scharf darstellten und schwächer anfärbten als nach Auftrennung bei pH 8.6. Wegen dieses schlechten Resultats wurde auf den Versuch einer neuen Typisierung verzichtet.

Ein weiterer Arbeitsaufwand mit dem Ziele besserer Auftrennung und Klassifizierung erübrigte sich außerdem deshalb, weil die Untersuchung der hitzestabilen alkalischen Serumphosphatase - entgegen den Erwartungen - keinen so vielfältigen Polymorphismus erbrachte wie die Plazenta-Extrakte und auch keine deutliche Zuordnung zu den Plazentatypen erlaubte. Mit gutem Willen ließen sich etwa 4 Serumtypen unterscheiden, die in Abb. 6 skizziert sind (Typen I bis IV). Sie stimmen nicht mit den Mustern überein, die BECKMAN und GRIVEA bei pH 9.2 erhielten (Abb. 1). Die Differenzierung wurde vor allem durch die schwache Anfärbung und die schlechte Auftrennung bei pH 6.0 kompliziert, die noch ungünstiger war als die der Plazenta-Extrakte. Ein Vergleich zwischen Serum- und Plazentatyp der untersuchten Frauen (Abb. 6) zeigt lediglich, daß einfache Muster wie I sowie S und F und mehrbandige Muster wie II, III, IV und FS, SI, FI eher, aber keineswegs immer, kombiniert auftreten. Dieser vage Zusammenhang ist forensisch nicht verwertbar.

Auch die Nabelschnurseren waren unergiebig. Sie wiesen bis auf eine Ausnahme nur eine einzige Bande auf, die wie bei BOYER sowie BECKMAN und GRIVEA nicht so weit wanderte wie die Zonen aus Geburtsblut und Plazenta-Extrakten (Abb. 4 und 5).

Die von den letztgenannten Autoren in 4-5% der Fälle beobachteten Muster mit 2 Fraktionen wurden - möglicherweise wegen der kleinen Zahl der Proben - seltener gefunden.

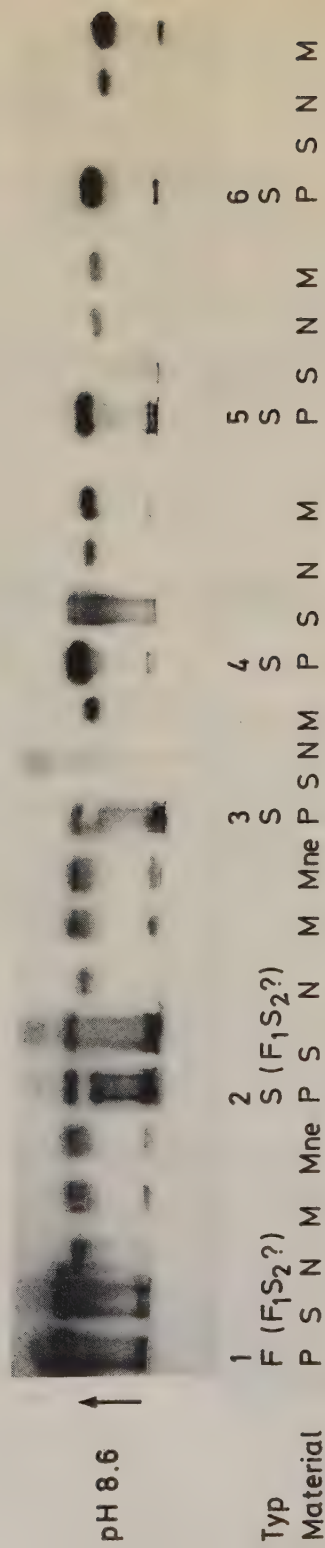


Abb. 5. Darstellung der hitzestabilen alkalischen Phosphatase bei pH 8.6 aus Plazenta-Extrakten (P), Spuren von Geburtsblut (S), erhitzten Nabelschnurseren (N), erhitzten Seren von Müttern zum Geburtstermin (M) sowie nicht-erhitzten mütterlichen Seren (Mne); kein Unterschied zwischen erhitzten und nichterhitzten Seren; schlechte und fehlende Darstellung der Banden bei Spuren nach 7 Monate langer Lagerung bei Zimmertemperatur (Proben 4, 5 und 6); schnellere Wanderung als das Muster des zugehörigen Plazenta-Extraktes bei einer 6 Monate alten Spur (Probe 3)

Serumtyp		I	II	III	IV	
pH 8.6 ↑ pH 6.0 ↑						
	n	33	18	10	5	66
	%	50	27	15	8	100
Plazentatyp						
S	n	18	8	2	0	28
	%	54	44	20	0	
FS	n	8	4	6	4	22
	%	24	22	60	80	
F	n	3	2	1	0	6
	%	9	11	10	0	
SI	n	2	4	1	0	7
	%	6	22	10	0	
FI	n	2	0	0	1	3
	%	6	0	0	20	

Abb. 6. Schematische Darstellung von Serumtypen der hitze-stabilen alkalischen Phosphatase bei Frauen zum Geburtstermin und Plazentatypen dieser Probandinnen; die Prozentzahlen der senkrecht aufgegliederten Plazentatypen beziehen sich auf die Gesamtzahlen der zugehörigen Serumtypen oberhalb der senkrechten Reihen (Auftrennung nach ROBSON und HARRIS)

Die 5 Seren nichtschwangerer Vergleichsprobanden wiesen nur eine schmale Bande auf, die sich in der Auftrennung bei pH 8.6 sehr schwach und bei pH 6.0 gar nicht anfärbte. Sie lief etwas langsamer als Typ I. Dieses Resultat war auch erwartet worden, da ja bei den nichtschwangeren Personen der sehr hohe Anteil der plazentaren alkalischen Phosphatase wegfiel.

Die auf Stoff getrockneten Blutspuren entwickelten nach Kochsalzelution ebenso wie frische oder gealterte Plazenta-Extrakte auf der ganzen Laufstrecke eine Färbung von der Breite der Impfschlitze, die mit Zunahme von Alter und Konzentration der Proben die spezifischen Zonen immer schlechter erkennen ließ (Abb. 4 und 5).

Gegenüber unterschiedlichen Aufbewahrungsbedingungen (18 Tage bei Zimmertemperatur sowie 9 Monate bei -20°C) erwiesen sich die Muster der Seren ebenso wie die der Plazenta-Extrakte als stabil, während die Blutspuren schon nach 3 bis 4 Tagen eine Diagnose nicht mehr erlaubten. KÖHLER konnte noch an 19 Monate alten Blutspuren mit Hilfe der photometrischen Bestimmung den hitzestabilen Anteil der alkalischen Phosphatase erfassen.

Eine Verlagerung der Zonen, wie sie ROBSON und HARRIS durch Einwirkung von Neuraminidase hervorriefen, wurde jedoch bis auf eine Ausnahme (Abb. 5, Probe 3) nicht beobachtet.

Auf die Inkubation der Seren bei 56°C für 30 Minuten hätte vermutlich verzichtet werden können, da der Anteil

der hitzelabilen alkalischen Phosphatase bei 18 ohne und nach Erhitzen untersuchten Schwangerenserren minimal war, so daß er sich bei der Darstellung in der Elektrophorese nicht auswirkte.

Es wurde noch die Frage einer Korrelation zwischen ABO-System und Polymorphismus der alkalischen Phosphatase geprüft (Tab. 2), da eine Abhängigkeit für die hitzelabile Fraktion als sicher angenommen wird (APFOPS et al.; HAMPTON et al.; BECKMAN; FICHTNER et al.; WALTER).

		S	FS	F	SI	FI	
A	n	11	13	2	3	1	30
	%	35	59	33	50	25	
AB	n	0	1	1	0	1	3
	%	0	4	17	0	25	
B	n	4	3	2	2	0	11
	%	13	14	33	33	0	
O	n	16	5	1	1	2	25
	%	52	23	17	17	50	
		31	22	6	6	4	66

Tab. 2. Plazentatypen der hitzestabilen alkalischen Phosphatase und ABO-Gruppe der untersuchten Frauen

Hinsichtlich des hitzestabilen Anteils wurde nur von BOTTINI et al. ein Zusammenhang behauptet: sie registrierten einen signifikanten Mangel an F-Typen bei B-Individuen und sahen die Ursache hierfür in einer Wechselwirkung zwischen den beiden Systemen während der Schwangerschaft. Eine solche Tendenz geht aus unserem Untersuchungsgut nicht hervor. Diese Aussage kann jedoch wegen der kleinen Zahl der Fälle nicht als Gegenbeweis gewertet werden und wurde aus diesem Grunde auch nicht statistisch ausgewertet.

Ein so ungünstiges Ergebnis hinsichtlich der Eignung der hitzestabilen alkalischen Phosphatase für rechtsmedizinische Aufgaben (Blutspurendiagnostik) war nach den Erfahrungen mit anderen Enzymen nicht zu erwarten: sowohl die Phosphoglukomutase als auch die Adenylatkinase und die Adenosindesaminase erlauben eine Zuordnung von Gewebetypen (Muskulatur) zu den Typen der Erythrozyten trotz abweichender Ausprägung (OEPEN; OEPEN und MERTENS). Obwohl der plazentare Ursprung der hitzestabilen alkalischen Serum-Phosphatase schwangerer Frauen außer Zweifel steht, unterscheidet sich die lösliche Form im Serum von der zellgebundenen Form der Plazenta. Demnach wirkt sich offenbar auch gegenüber dem mütterlichen Kreislauf ebenso wie gegenüber dem des Kindes ein Schrankenmechanismus aus, der den Kohlenhydratanteil oder die Untereinheiten des Enzyms betreffen kann (FISHMAN).

C. Zusammenfassung

1. Plazenta-Extrakte weisen in der horizontalen Stärkegel-Elektrophorese einen Polymorphismus der alkalischen Phosphatase auf, der nach ROBSON und HARRIS vom Genotyp des Feten bestimmt wird. In 73 untersuchten Plazentaprobe wurden 5 der 6 häufigen Phänotypen beobachtet, deren Frequenz sehr gute Übereinstimmung mit den Werten der britischen Autoren aufwies. Die Typen waren jedoch sehr schwer zu klassifizieren, was bei genauerem Vergleich mit den Originalfotos dieser Autoren auch deren Befunden entsprach.

2. In 66 Seren von Müttern wurde zum Geburtstermin zwar ebenfalls ein Polymorphismus der hitzestabilen alkalischen Phosphatase beobachtet, der jedoch nur 4 Typen umfaßte und keine sichere Zuordnung zu den Plazentamustern gestattete.

3. Die 66 untersuchten Nabelschnurseren wiesen in Übereinstimmung mit anderen Autoren bis auf eine Ausnahme nur eine einzige Bande auf, die langsamer wanderte als die Serum-Fraktionen der erwachsenen schwangeren und nicht-schwangeren Probanden.

4. Die Phänotypen der hitzestabilen alkalischen Phosphatase ließen sich an getrockneten Blutspuren noch schlechter darstellen als an frischen Plazenta-Extrakten und Seren, da sich hier die Zonen schon nach 3 bis 6 Tagen verbreiterten und das Muster verdeckten.

5. Hitzelabile alkalische Phosphatase war bei 18 Seren, die auch ohne Erhitzen untersucht wurden, nur gering konzentriert und störte die Darstellung des hitzestabilen Enzyms nicht.

6. Entgegen den Erwartungen hat der Polymorphismus der hitzestabilen alkalischen Phosphatase keine rechtsmedizinische Bedeutung.

D. Literatur

- ARFORS, K., BECKMAN, L. and L. LUNDIN: Genetic variations of human serum phosphatases. Acta genet. (Basel) 13, 89-94 (1963)
- BAMFORD, K., HARRIS, H., LUFFMAN, J., ROBSON, E. and T. CLEGHORN: Serum-alkaline-phosphatase and the ABO blood-groups. Lancet 1965/I, 530-531
- BECKMAN, G. and L. BECKMAN: The placental alkaline phosphatase polymorphism. Variations in Hawaiian subpopulations. Human Hered. 19, 524-529 (1969)
- BECKMAN, L.: Associations between human serum alkaline phosphatases and blood groups. Acta genet. (Basel) 14, 286-297 (1964)
- BECKMAN, L. and M. GRIVEA: Serum alkaline phosphatase variations in pregnant women and newborn children. Acta genet. (Basel) 15, 218-223 (1965)
- BECKMAN, L., BECKMAN, G., CHRISTODOULOU, C. and A. IFEKWUNIGWE: Variations in human placental alkaline phosphatase. Acta genet. (Basel) 17, 406-412 (1967)
- BOTTINI, E., LUCARELLI, P., PIGRAM, P., PALMARINO, R., SPENNATI, G. and M. ORZALESI: Interaction between placental alkaline phosphatase and ABO system polymorphisms during intrauterine life. Amer. J. hum. Genet. 24, 495-504 (1972)
- BOTTINI, E., LUCARELLI, P. and F. GLORIA: Placental alkaline phosphatase and ABO system polymorphisms: Analysis of relationships among gene frequencies in human populations. Further evidence at the population level for an interaction between the two polymorphisms. Amer. J. hum. Genet. 24, 505-513 (1972)

- BOYER, S.: Alkaline phosphatase in human sera and placentae. Science 134, 1002-1004 (1961)
- CAYLA, J. et F. FABRE: La phosphatase sérique pendant la gestation. Compt. rend. Soc. de biol. 120, 748-750 (1935)
- FICHTNER, K., CLEVE, H., KRÜPE, M. und G. WENDT: Die blutgruppenassoziierten Elektrophoresetypen der alkalischen Serumphosphatase bei Gesunden und bei Patienten mit gastrointestinalen Erkrankungen. Humangenetik 4, 244-261 (1967)
- FISHMAN, W.H.: Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. Amer. J. Med. 56, 617-650 (1974)
- GOTTLIEB, A.J. and H.H. SUSSMAN: Human placental alkaline phosphatase: molecular weight and subunit structure. Biochim. Biophys. Acta 160, 167 (1968)
- HAAG, V.: Untersuchungen zum Nachweis von Abort- und Geburtsblut in Blutflecken mittels des immunologischen Schwangerschaftstests. Diss. Marburg 1968
- ISHIMOTO, G.: Distribution of placental alkaline phosphatase types in an Japanese population. Human Hered. 20, 193-198 (1970)
- KÖHLER, W.: Über einen photometrischen Schwangerschaftsnachweis an hämolysefreiem und hämolytischem Serum sowie an getrockneten Blutflecken mit Hilfe der hitzestabilen alkalischen Phosphatase. Diss. Marburg noch unveröffentlicht
- LAWRENCE, S.H. and H.E. WEIMER: A species comparison of serum proteins and enzymes by starch gel electrophoresis. Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 105, 572-575 (1960)

McMASTER, Y., TENNANT, R., CLUBB, J., NEALE, F. and S. POSEN:
The mechanism of the elevation of serum alkaline phosphatase in pregnancy. J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp. 71, 735-739 (1964)

MILLER, Z.B., NAOR, E., MILKOVICH, L. and W.M. SCHMIDT:
Serum levels of cystine aminopeptidase, leucine aminopeptidase, and alkaline phosphatase in single and twin pregnancies. Obstet. Gynec. 24, 707 (1964)

OEPEN, I.: AB-, Rh-, Gm-, InV- und PGM-Bestimmung an Haut, Muskulatur, Milz und Niere zur Identifizierung von Leichenteilen. Beitr. gerichtl. Med. 31, 300-306 (1973)

OEPEN, I. und G. MERTENS: Bestimmung der Adenylatkinase- und der Adenosindesaminase-Typen an Leichenmuskulatur. Beitr. gerichtl. Med. 32, 148-151 (1974)

OYA, M.: Quantitative estimation of heat-stable alkaline phosphatase activity in dried blood stains and its application to the forensic diagnosis of pregnancy. Z. Rechtsmedizin 73, 7-10 (1973)

POULIK, M.D.: Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. Nature 180, 1477-1479 (1957)

ROBSON, E. and H. HARRIS: Genetics of the alkaline phosphatase polymorphism of the human placenta. Nature (Lond.) 207, 1257-1259 (1965)

ROBSON, E. and H. HARRIS: Further studies on the genetics of placental alkaline phosphatase. Ann. hum. Genet. 30, 219-232 (1967)

SCHLEYER, F.: Leitfaden der gerichtlich-medizinischen Blutspuren-Untersuchung. Schmidt-Römhild, Lübeck 1966

- SMITHIES, O.: Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. Biochem. J. 61, 629 (1955)
- THOMAS, D. and H. HARRIS: Comparison of thermostabilities of different human placental alkaline phosphatase phenotypes. Ann. hum. Genet. 35, 221-224 (1971)
- WALTER, H.: Untersuchungen zur Populationsgenetik der alkalischen Serumphosphatase-Gruppen. Blut 17, 166-170 (1968)

Frau Prof. Dr. med. I. Oepen bin ich für die Überlassung des Themas, für ihre wertvollen Anregungen und Hinweise während der Versuche, für ihre ständige Hilfsbereitschaft und für ihre Beratung bei der Abfassung des Textes zu großem Dank verpflichtet.

Fräulein G. Mertens danke ich herzlich für ihre technischen Hinweise und die Anfertigung der Lichtbilder.

Lebenslauf

Am 4. März 1947 wurde ich als Sohn des Kaufmannes Siegfried Müller und seiner Ehefrau Martha, geb. Kunzmann in Stendal/Altmark geboren.

Von 1953 bis 1961 besuchte ich die Comenius-Schule in Stendal. Im August 1961 flüchtete unsere Familie aus der DDR in die Bundesrepublik Deutschland.

Da sich meine Eltern in Harsewinkel/Westfalen eine neue Existenz aufbauen konnten, besuchte ich von Herbst 1961 bis 1967 das Staatliche Aufbaugymnasium in Warendorf; an dieser Schule bestand ich am 3.7.1967 die Reifeprüfung.

Nach 1^{1/2}-jähriger Grundwehrdienstzeit beim Bundesgrenzschutz in Uelzen begann ich nach einem 7-monatigen Krankenpflagedienst im St. Elisabeth-Hospital in Gütersloh im Wintersemester 1969/70 mit dem Studium der Fächer Chemie, Physik und Sport an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster.

Im Sommersemester 1970 nahm ich an der Universität Köln das Medizinstudium auf, wo ich 1971 die naturwissenschaftliche Vorprüfung ablegte. Vom Wintersemester 1971/72 an setzte ich mein Studium an der Philipps-Universität Marburg fort. Hier bestand ich 1972 die ärztliche Vorprüfung.

Mein Studium beendete ich am 16.12.1975 mit der ärztlichen Staatsprüfung in Marburg.

Seit dem 1.1.1976 bin ich als Medizinalassistent am Institut für Rechtsmedizin der Universität Marburg tätig.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten:

in Münster: Bambauer, Becher, Engels, Hellenthal, Kappler,
Klaus, Nacke-Erich

in Köln: Benninghoven, Bergmann, Grimme, Hirsch, Jahrreiß,
Kowallik, Kummer, Lutz, Ortmann, Stoffel, Tischen-
dorf, Vahs, Vogel, Weber

in Marburg: Amon, Arndt, Buchholz, Castenholz, Daume, Dittrich,
Dombrowski, Doss, Exner, Friederich, Ganz, Gössel,
Graul, Haberich, Hamelmann, Hardewig, Havemann,
Hensel, Heß, Hering, Hildebrandt, Hilgermann,
Hort, Jacob, Kaffarnik, Kalbfleisch, Karlson,
Klaus, Klein, Kleinsasser, Koransky, Lauer,
Linneweh, Mannheim, Maroske, Martini, Neurath,
Oepen, I., Petry, Pots, Riecken, Rodeck, Rohen,
Rosenthal, Schaumlöffel, Schiff, Schleyer, Schmid,
Schmitz-Moormann, Schneider, Seidel, Siegert,
Straub, Uhlarik, Welge-Lüßen, Willenbockel

